

氏 名	高山 和士
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	第 5 3 4 6 号
学位授与年月日	平成 2 1 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
学 位 論 文 名	RNA Interference for Noggin Enhances the Biological Activity of Bone Morphogenetic Proteins in vivo and in vitro (Noggin siRNA 導入による BMP の骨分化誘導作用増強)
論文審査委員	主 査 教 授 高岡 邦夫                      副 査 教 授 三木 隆己 副 査 教 授 木山 博資

## 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】BMP の臨床応用における問題点として、ヒトの BMP 応答性が低いために BMP が高用量必要で、費用が高価となり汎用が困難な状態にある。以前より我々は BMP 低用量化に有効な薬剤や DDS の研究を行ってきた。本研究では、BMP アンタゴニストの Noggin に注目して、BMP と Noggin siRNA 併用による BMP の骨分化誘導作用増強について in vitro、in vivo で検討した。

【方法】筋芽細胞株 C2C12 細胞を用い、BMP を投与した際の内因性 Noggin の発現を real-time RT-PCR、Western blot にて評価した。次に Noggin siRNA オリゴヌクレオチドを作成し、リポフェクション法にて C2C12 細胞に遺伝子導入して、Noggin の発現抑制を real-time RT-PCR、Western blot にて評価した。さらに real-time RT-PCR と、ALP assay にて siRNA 導入による BMP の骨分化促進作用を評価した。In vivo では、マウス背筋膜下異所性骨形成モデルを使用した。ICR マウス背筋内に、作成した Noggin siRNA を注入し、Electroporation 法にて筋肉内に遺伝子導入して、同部に BMP 含有 collagen disk を埋植した。2 日後に周囲筋組織を採取して RNA を抽出し、real-time RT-PCR、Western blot にて Noggin mRNA、タンパクの発現レベルを評価し、組織免疫学的にも検討した。2 週後に新生骨を摘出して Soft X-ray を撮影し、DXA により Bone mineral contents (BMC) を計測した。

【結果】BMP 投与による C2C12 細胞での用量、時間依存的な内因性 Noggin 発現を確認し、siRNA 導入による Noggin 発現抑制についても mRNA、タンパクレベルにて確認した。また siRNA 導入により、BMP 投与による Osteocalcin mRNA の発現上昇と、ALP 活性上昇のさらなる増強効果が確認された。In vivo でも周囲筋組織での Noggin mRNA、タンパクの発現抑制と、抗 Noggin 抗体陽性細胞減少を確認し、siRNA 導入群での新生骨形成増大と BMC の有意な上昇を確認した。

【結論】Noggin siRNA 導入により in vitro では BMP の骨芽細胞系分化作用が促進され、in vivo では異所性仮骨形成の増大が確認された。今後は大型動物での使用や、さらに安全で有効な遺伝子導入法についても検討を行い、臨床応用の可能性を検索する予定である。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

整形外科領域において骨損傷部位での癒合を促進させたり、骨欠損を修復させる技術は未だ十分でなく、新しい技術が開発できればその臨床的価値は非常に高い。最近では骨形成促進の活性を有する生理的活性タンパク Bone morphogenetic protein (BMP) を用いた新しい骨再生が、欧米では脊椎固定や骨折偽関節の症例に限定して行われている。しかしその技術の問題点としてヒトでは BMP 応答性が低いために BMP が高用量必要で、その結果費用が高価となり汎用が困難な状態にある。そこで以前より当教室では BMP 低用量化に有効な薬剤や担体の研究を行い発表してきた。

本研究では、BMP の主要な生理的細胞外アンタゴニストである Noggin に注目して、BMP の活性増強を試みた。配列特異的に標的遺伝子の発現抑制が可能である short interfering RNA (siRNA) の手法で、Noggin siRNA を作成し、Noggin siRNA 導入による Noggin 発現抑制によって、BMP の骨分化誘導作用増強、骨形成促進効果が得られるかについて in vitro、in vivo 実験で検討した。BMP 応答性を示す筋芽細胞株 C2C12 細胞を用い、BMP を投与した際の内因性 Noggin の発現増加を real-time RT-PCR、

Western blot にて確認した。次に Noggin siRNA オリゴヌクレオチドを作成し、リポフェクション法にて C2C12 細胞に遺伝子導入して、Noggin の発現抑制を real-time RT-PCR、Western blot にて評価した。さらに real-time RT-PCR と、alkaline phosphatase assay にて siRNA 導入による骨芽細胞系分化マーカーの発現の変化を評価し、BMP の骨分化促進作用の増強効果を評価した。In vivo 実験では、BMP によるマウス背筋膜下異所性骨形成モデルを使用した。ICR マウス背筋内に、Noggin siRNA を注入し、Electroporation 法にて筋肉内に局所導入して、同部に BMP 含有 collagen disk を埋植した。2 日後に周囲筋組織を採取して RNA を抽出し、real-time RT-PCR、Western blot にて Noggin の mRNA、タンパク発現レベルを評価し、組織免疫学的にも検討した。2 週後に新生骨を摘出して Soft X-ray を撮影し、DXA により Bone mineral contents (BMC) を計測した。結果として、BMP 投与による C2C12 細胞での用量、時間依存的な内因性 Noggin 発現上昇を確認し、siRNA 導入による Noggin 発現抑制についても mRNA、タンパクレベルにて確認できた。また siRNA 導入により、BMP 投与による骨芽細胞系分化マーカーである Osteocalcin mRNA の発現上昇と、alkaline phosphatase 活性上昇のさらなる増強効果が確認された。In vivo 実験でも BMP 含有 collagen disc 周囲筋組織での Noggin mRNA、タンパクの発現抑制と、抗 Noggin 抗体陽性細胞減少を確認し、Noggin siRNA 導入群での新生骨形成増大と BMC や骨量の有意な上昇を確認した。以上の結果から、Noggin siRNA 導入により in vitro では BMP による未分化間葉系細胞の骨芽細胞系分化が促進され、in vivo では異所性新生骨形成の増大が確認された。以上の研究結果は、Noggin siRNA の局所導入が、BMP による骨形成性能を増強させることを明らかにしたものである。この研究は BMP の低用量化や、BMP による骨再生という臨床応用に向けた重要な基礎的実験結果であると考えられる。よって本研究は博士（医学）の学位を授与されるに値すると認められた。